

# TREHALOSE PHOSPHORYLASE, RECOMBINANT VECTOR CONTAINING THE GENE, AND TRANSFORMANT CONTAINING THE VECTOR AND PRODUCT THEREFROM

Patent Number: JP10327887

Publication date: 1998-12-15

Inventor(s): INOUE YASUSHI; TOMITA TETSUJI; ISHII KEIKO; OOSHIMA YOSHIE; YAMANE KUNIO

Applicant(s): SHOWA SANGYO CO LTD

Requested Patent: JP10327887

Application Number: JP19980098147 19980327

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N15/09 ; C07H3/04 ; C12N1/21 ; C12N9/12 ; C12P19/02 ; C12P19/12

EC Classification:

Equivalents:

## Abstract

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a DNA for producing recombinant microbes capable of well productively preparing recombinant heat-resistant trehalose phosphorylase in high purity, by extracting it from the specific microbe capable of producing heat-resistant trehalose phosphorylase.

**SOLUTION:** This DNA is obtained from *Bacillus stearothermophilus* SK-1(FERM P-14567) belonging to thermophilic *Bacillus* bacteria and has the base sequence from No.279 to No.2573 in the base sequence of the formula. The DNA encoding recombinant heat-resistant trehalose phosphorylase having the following properties is obtained by culturing the recombinant microbes obtainable on the basis of the DNA by the genetic engineering technique: (1) specifically reactive with trehalose and capable of reversible phosphorolysis; (2) having optimal temperature of about 70-75 deg.C and optimal pH of 6.5-7.5 and stable in pH ranging from 6.0 to 8.0; (3) having a molecular weight of 110000-150000 (according to gel filtration chromatography); (4) having an isoelectric point of 4.6-5.2.

(10)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-327887

(13)公開日 平成10年(1998)12月15日

(51)Int.Cl.  
C 12 N 15/09  
C 07 H 3/04  
C 12 N 1/21  
9/12  
C 12 P 19/02

識別記号  
ZNA

F I  
C 12 N 15/00  
C 07 H 3/04  
C 12 N 1/21  
9/12  
C 12 P 19/02

ZNAA

審査請求 未請求 請求項の数12 FD (全 22 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平10-98147  
(22)出願日 平成10年(1998) 3月27日  
(31)優先権主張番号 特願平9-115994  
(32)優先日 平9(1997) 3月31日  
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000187079  
昭和産業株式会社  
東京都千代田区内神田2丁目2番1号  
(72)発明者 井上 靖  
千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業  
株式会社総合研究所内  
(72)発明者 富田 哲司  
千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業  
株式会社総合研究所内  
(72)発明者 石井 圭子  
千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業  
株式会社総合研究所内  
(74)代理人 弁理士 長沼 要

最終頁に統く

(54)【発明の名称】組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター  
及び該ベクターを含む形質転換体とその産生物

(57)【要約】

【課題】組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼを  
コードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該  
組換えベクター含む形質転換体、該形質転換体を培養し  
て組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼを製造する  
方法、及び該酵素の利用法を提供すること。

【解決手段】以下の(a)又は(b)のDNAからなる  
遺伝子。

(a)配列表の配列番号1に記載の塩基配列の内、塩基  
番号279から2573で表される塩基配列からなるD  
NA。

(b)塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェン  
トな条件下でハイブリダイズし、かつ下記の酵素化学的  
性質を有する組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼ  
をコードするDNA。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のDNAからなる遺伝子。

(a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列の内、塩基番号279から2573で表される塩基配列からなるDNA。

(b) 塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ下記の酵素化学的性質を有する組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードするDNA。

## (1) 作用

トレハロースを可逆的に加リン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でトレハロースに作用させると、等モルのグルコースと $\beta$ -グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースと $\beta$ -グルコース-1-リン酸に作用させると等モルのトレハロースとリン酸を生成する。

## (2) 基質特異性

トレハロースに特異的に作用する。

## (3) 至適温度

トレハロース加リン酸分解反応の至適温度は70°C~75°C付近で、60°C~75°Cの範囲で最高活性の約50%以上を示す。

## (4) 熱安定性

10 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH 6.0)中で、65°C、15分間処理後に無処理の95%以上の活性を有する。

## (5) 至適pH

6.5~7.5。

## (6) pH安定性

pH 6.0~8.0で安定。

## (7) 失活

100°C、10分間の加熱で100%失活する。

## (8) 分子量

ゲルエキクロマトグラフィーにより測定した値は11万~15万。

## (9) 等電点

4.6~5.2。

## (10) 阻害剤

HgCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub>で著しく活性が阻害される。

【請求項2】 配列表の配列番号1に記載の塩基配列の内、塩基番号279~2573で表される塩基配列からなるDNAが好熱性バチルス属細菌由来のものである請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 好熱性バチルス属細菌由来のものがバチルス・ステアロサーモフィラスSK-1(FERM P-14567)である請求項1又は請求項2に記載の遺伝子。

【請求項4】 請求項1、2又は3に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項5】 遺伝子がバチルス・ステアロサーモフィ

ラスSK-1(FERM P-14567)の染色体由来の3.3k塩基対のDNA断片である請求項4記載の組換えベクター。

【請求項6】 遺伝子がバチルス・ステアロサーモフィラスSK-1(FERM P-14567)の耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードする遺伝子部分である2295塩基対のDNA断片である請求項4記載の組換えベクター。

【請求項7】 ベクターがプラスミドベクターpSTP1由来のものである請求項4、5又は6記載の組換えベクター。

【請求項8】 請求項4、5、6又は7に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項9】 形質転換体が大腸菌である請求項8記載の形質転換体。

【請求項10】 請求項8又は請求項9に記載の組換え形質転換体を培養して、組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼを製造する方法。

【請求項11】 請求項10に記載の組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼ及び耐熱性マルトースホスホリラーゼの存在下に、マルトースとリン酸もしくはリン酸塩と、水性媒体中で、反応させることを特徴とするトレハロース又は $\beta$ -グルコース-1-リン酸の製造方法。

【請求項12】 請求項11の反応が55~70°C、pH 4.5~8.0で行われる請求項11記載のトレハロース又は $\beta$ -グルコース-1-リン酸の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクターとその形質転換体、該形質転換体を用いた組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼの製造方法、及び該組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼを用いたトレハロース又は $\beta$ -グルコース-1-リン酸の製造法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】トレハロースは、酵母、かび、細菌、昆虫等に広く分布する二糖類で、他の二糖類に比べて安定なことから蛋白質等の乾燥保護剤(特表昭63-500562)としての利用等が考えられている有用な糖質である。

【0003】従来、トレハロースを調製する方法としては、酵母からの抽出法(特開平5-292986)、細菌による発酵法(特開平5-211882)等が知られている。しかし、これらの方法で調製したトレハロースは、大量生産が操作的、設備的に困難である、不純物除去工程が複雑である等の理由から製造コストが高くなり、非常に高価であるため食品用途には利用することができなかった。

【0004】一方、安価にトレハロースを調製する有効な方法として酵素法が挙げられる。その一つとして、マルトースホスホリラーゼとトレハロースホスホリラーゼを用いた同時反応法がある（特公昭63-60998）。この方法は2種類のホスホリラーゼがそれぞれマルトースとトレハロースに作用して可逆的に加リン酸分解しグルコースとβ-グルコース-1-リン酸を生じる反応を利用したもので、安価な原料であるマルトースに両酵素を同時に作用させるとトレハロースが生成するものである。

【0005】これまでに知られているトレハロースホスホリラーゼとしては、トレハロースを加リン酸分解してグルコースとα-グルコース-1-リン酸を生じるものとグルコースとβ-グルコース-1-リン酸を生じるものがある。

【0006】前者の反応を行うものとしては、フラムリナ・ベルティペス (*Flammulina velutipes*) (FEMS Microbiol. Lett., 55, 147, 1988) やグリフォラ・フロンドサ (*Grifola frondosa*) (日本農芸化学会誌, 68, 580, 1994)、シゾフィラム (*Schizophyllum*)、アガリカス (*Agaricus*)、プレウロルス (*Pleurotus*)、リフィラム (*Lophophyllum*)、レンチナス (*Lentinus*)、コリオラス (*Coriolus*)、パナス (*Panus*)、クレツドツス (*Crepidotus*)、トリキャプタム (*Trichaptum*)、フォリオタ (*Pholiota*)、ピクノポラス (*Pycnoporus*)、コリオラス (*Coriolus*)、クリニペリス (*Crinipellis*)、ガノデルマ (*Ganoderma*)、グレオフィラム (*Gloeophyllum*)、トリコローマ (*Tricholoma*) 等のキノコ類が产生するもの（特開平6-189779、特開平7-99988、特開平7-255473、特開平8-89273）、リゾバス・アジゴスボルス (*Rhizopus azygosporus*)などのカビ類が产生するもの（特開平9-28375）、酵母ピヒア・ファーメンタヌス (*Pichia fermentans*) が生産するもの (Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, 1088-1095, 1995) が挙げられる。

【0007】後者の反応を行うものとしては、緑藻ユーグレナ・グラチリス (*Euglena gracilis*) (J. Biol. Chem., 274, 3223, 1972) が产生するもの、放線菌カテラトスボラ・フェルジネラ (*Catellatospora ferruginosa*) K Y2039 (FEMS Microbiol. Lett., 55, 147-150, 1995)、キネオスピリア・オウランニアカ (*Kineosporia aurantiaca*) ATCC 29727等が生産するもの（特開平7-59584）、細菌ミクロコッカス・パリアンス (*Micrococcus varians*) が生産するもの（特開平7-284389）、プレシオモナス (*Plesiomonas*) が生産するもの（特開平8-131157）、アルスロバクター・シトレウス (*Arthrobacter citreus*)、バチルス・サーキュラヌス (*Bacillus circulans*)、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*)、コリネバクテリウム・ゼロシス (*Corynebacterium xerosis*)、フラボバクテ

リウム (*Flavobacterium*)、ミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*)、セラチア (*Seratia*)、ストレプトマイセス・フラボビレンス (*Streptomyces flavovirens*)、キサントモナス・キャンペストリス (*Xanthomonas campestris*) が生産するもの（特開平8-280395）が挙げられる。

【0008】これらのトレハロースホスホリラーゼの内、酵素化学的に酵素の特性が詳細に調べられているものは、ミクロコッカス・パリアンス（特開平7-284389）及びプレシオモナス（特開平8-131157）である。これらの酵素の熱安定性は、高いものでも50°C以下と低く、工業的製造条件で利用するのは困難である。

【0009】一般に、工業的に酵素反応で生産を行う場合、雑菌汚染の低減の目的から反応温度は55°C以上の高温が一般的に採られている。反応温度の高温化は基質と生産物の溶解度を上げて単位体積当たりの仕込量を多くすることができ、且つ、酵素反応速度が早くなり反応時間の短縮化ができる等の利点があるので、コスト的にも有利である。このようなことから工業的に使用される酵素は、一般的には熱安定性の優れたものが選ばれる。

【0010】また、工業的に使用される酵素は、生産コストを下げるためにより安価であることも求められる。つまり、酵素生産微生物は酵素生産性が高いことを要求される。

【0011】この様な状況に鑑み、本発明者らは高温での酵素反応によるトレハロースの製造を行える高い熱安定性を有する耐熱性トレハロースホスホリラーゼにつき銳意探索したところ、好熱性バチルス属細菌が生産するトレハロースホスホリラーゼが55°C以上の温度で使用しても失活しないことを見出した（特開平8-131166）。

【0012】しかしながら、これらの微生物は酵素の生産能力が十分でなく、トレハロースやβ-グルコース-1-リン酸を大量に生産しようとすると、微生物を大量に培養しなければならないという問題があった。この問題を解決するためには従来は、微生物の酵素生産能を改善する煩雑な育種操作を行っていた。具体的には、野生株を紫外線、エックス線、薬品（NTG（N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン）、EMS（エチルメタンスルホネート）等）等を用い人工的変異手段で変異処理し、酵素生産性の向上した変異株を作製するといったものである。

【0013】また、トレハロースホスホリラーゼの生産がトレハロースによって誘導される微生物が多く、酵素生産培地の原料に高価なトレハロースを必要とする場合がある。このため当然ながらトレハロースホスホリラーゼ生産コストが高くなり、トレハロース製造コストも高くなる問題がある。この問題を解決する方法の一つとして、人工的変異によって酵素生産誘導が起こらなくなつ

た構成的変異株を作成する方法が考えられる。

【0014】そこで、本発明者らも、トレハロースホスホリラーゼ活性をもつバチルス属細菌に対して変異処理を行い、約1万株の変異株を調べたが、思惑とは異なり、トレハロースによる酵素生産誘導が解除された構成的変異株を得ることができなかった。このことは、トレハロースホスホリラーゼの遺伝子とトレハロースによる誘導に関連する遺伝子とが、何らかの関連を持って運動している可能性を示唆すると考えられた。この問題を解決するためには、偶然に頼る変異処理ではなく、遺伝子を単離して塩基配列を解析する遺伝子工学的な方法を探る必要があると考えられた。

【0015】一方、現在は、全アミノ酸配列が解明されていない酵素であっても、これをコードする遺伝子を単離し、その塩基配列を解明できれば、その酵素をコードするDNAを含む組換えDNAを作製し、これを微生物や動植物の細胞に導入して得られる形質転換体を培養することにより、比較的容易に所望量の酵素が取得できるようになった。

【0016】そこで、かかる状況に鑑み、上記耐熱性酵素をコードする遺伝子を突き止め、その遺伝子配列を解析することは重要な技術的課題である。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該形質転換体を培養して組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼを製造する方法、及び該酵素の利用法を提供することを目的とする。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、高い熱安定性を有する耐熱性トレハロースホスホリラーゼを自然界より探索した結果、目的とする新規な耐熱性トレハロースホスホリラーゼを好熱性バチルス属細菌が產生することを見出し、特に神奈川県の山中の土壤から分離したバチルス・ステアロサモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) SK-1が強い耐熱性トレハロースホスホリラーゼ産生能を示すことを発見し、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センターへ寄託している (FERM P-14567)。

【0019】そして、更に研究を重ねた結果、本菌株の耐熱性トレハロースホスホリラーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子から構造遺伝子を見つけ、遺伝子工学を利用して、組換え微生物を作製することによって酵素の生産性が飛躍的に上昇し、不純物の少ない、高純度の組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼが効率よく調製できることを見出し、本発明を完成した。

【0020】次に、この組換え微生物を培養することにより、高純度の組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼを生産させ、これを利用してトレハロースを製造する

ことができるを見出した。

【0021】すなわち、本発明は、以下のとおりである。

【0022】1) 以下の(a)又は(b)のDNAからなる遺伝子。

【0023】(a)配列表の配列番号1に記載の塩基配列の内、塩基番号279から2573で表される塩基配列からなるDNA。

【0024】(b)塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ下記の酵素化学的性質を有する組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードするDNA。

【0025】(1)作用

トレハロースを可逆的に加リン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でトレハロースに作用させると、等モルのグルコースとβ-グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースとβ-グルコース-1-リン酸に作用させると等モルのトレハロースとリン酸を生成する。

【0026】(2)基質特異性

トレハロースに特異的に作用する。

【0027】(3)至適温度

トレハロース加リン酸分解反応の至適温度は70°C~75°C付近で、60°C~75°Cの範囲で最高活性の約50%以上を示す。

【0028】(4)熱安定性

1.0 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で、65°C、15分間処理後95%以上の活性を有する。

(5)至適pH

6.5~7.5。

【0029】(6)pH安定性

pH 6.0~8.0で安定。

【0030】(7)失活

100°C、10分間の加熱で100%失活する。

【0031】(8)分子量

ゲルエリートクロマトグラフィーにより測定した値は11万~15万。

【0032】(9)等電点

4.6~5.2。

【0033】(10)阻害剤

HgCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub>で著しく活性が阻害される。

【0034】なお、上記のDNAとして、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表の配列番号1に示す該当する塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えたものは、当然、本発明に包含される。

【0035】2)配列表の配列番号1に記載の塩基配列の内、塩基番号279から2573で表される塩基配列からなるDNAが好熱性バチルス属細菌由来のものである。

る上記1記載の遺伝子。

【0036】3) 好熱性バチルス属細菌由来のものがバチルス・ステアロサーモフィラスSK-1 (FERM P-14567) である上記1又は2に記載の遺伝子。

【0037】4) 上記1、2又は3に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【0038】5) 遺伝子がバチルス・ステアロサーモフィラスSK-1 (FERM P-14567) の染色体由来である3.3k塩基対のDNA断片である上記4記載の組換えベクター。

【0039】6) 遺伝子がバチルス・ステアロサーモフィラスSK-1 (FERM P-14567) の耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードする遺伝子部分である2.295塩基対のDNA断片である上記4記載の組換えベクター。

【0040】7) ベクターがプラスミドベクターpS TP1由来のものである上記4、5又は6記載の組換えベクター。

【0041】8) 上記4、5、6又は7に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【0042】9) 形質転換体が大腸菌である上記8記載の形質転換体。

【0043】10) 上記8又は請求項9に記載の組換え形質転換体を培養して、組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼを製造する方法。

【0044】11) 上記10に記載の耐熱性トレハロースホスホリラーゼ及び耐熱性マルトースホスホリラーゼの存在下に、マルトースとリン酸もしくはリン酸塩とを、水性媒体中で、反応させることを特徴とするトレハロース又はβ-グルコース-1-リン酸の製造方法。

【0045】12) 上記11の反応が55~70°C、pH4.5~8.0で行われる請求項11記載のトレハロース又はβ-グルコース-1-リン酸の製造方法。

【0046】本発明でいう「ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」とは、実施例2~3におけるハイブリダイズ溶液よりも構成成分濃度が高いか、ハイブリダイゼーション温度が高いか、洗浄液の構成成分濃度が高いか、洗浄液温度が高いかの場合をいう。

【0047】一般に、二本鎖のDNAは、熱やアルカリの処理により水素結合が解離して一本鎖となる(変性)、また、変性したDNAは徐々に温度を下げることにより、しだいにもとの二本鎖に復帰する(再生)。この変性と再生は、DNA二本鎖の塩基配列の相同志が高いほど、変性が起こりにくく(高い温度が必要)、再生しやすい。

【0048】そこで、今、異なる2種類の二本鎖DNAが試験管内に存在するとき、変性を行い、その後再生を行うことにより、異種のDNA同士は、相同意配列に依存して異種間の二本鎖を形成していく。

【0049】このような2種のDNAの間の二本鎖の会合を、ハイブリッド形成といい、この方法により異なるDNAの間の相同志を調べることをハイブリダイゼーション法と呼んでいる。

【0050】本発明は、このようなハイブリダイゼーション法により、DNAの検索や同定等を行なうものである。

【0051】ところで、本発明のDNAは、塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするという特性を有するものである。

【0052】このことは、本発明において、ハイブリダイゼーション法により、DNAの検索や同定等を行なう場合、ストリンジェントな条件下で行なえば、耐熱性トレハロースホスホリラーゼの構造遺伝子と相同志の高いDNAはハイブリダイズするが、逆に、相同志の低いものはハイブリダイズしないので、その結果、純度が極めて高い、該酵素由来のDNAが効率よく得ることがとなる。

【0053】したがって、本発明は、ハイブリダイゼーション法の操作条件の設定を工夫することにより、耐熱性トレハロースホスホリラーゼから、高純度の組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼのDNAを効率よく得ることができる。

【0054】本発明のDNAが、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするという特性を有する原因については、学問的には解明していないが、多分、前記の耐熱性トレハロースホスホリラーゼの(1)~(10)の酵素化学的性質の内、特に(3)の「至適温度」及び(4)の「熱安定性」という性質から来ているものと推察される。

【0055】本発明のDNAを入手する微生物としては、バチルス属に属し、耐熱性トレハロースホスホリラーゼ産生能を有する微生物であればいずれの微生物でもよい。特に、本発明者らが神奈川県の山中の土壤より分離したバチルス・ステアロサーモフィラスSK-1株(FERM P-14567)もしくはその突然変異体が好ましい。

【0056】本発明は、耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードする遺伝子を自律複製可能なベクターに組み込んだ、複製可能な組換えベクター及び該組換えベクターを宿主に導入してなる形質転換体を包含する。

【0057】自立複製可能なベクターとしては、pBR322、Bluescript II SK (+)、pUC18、pKK223-3、pCR2.1、pLEX、pJL3、pSW1、pSE280、pSE420、pHY300PLK等のプラスミドベクターやλgt11、入ZAP等のファージベクターが挙げられるが、大腸菌で発現させるには、pBR322、Bluescript II SK (+)、pUC18、pKK223-3、及びpCR2.1が好適であり、枯草菌で発現させるには、

PHY300PLKが好適である。

【0058】宿主としては、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母等が挙げられる。

【0059】また、本発明は、組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼをコードする遺伝子を含む組換えベクターを宿主に導入してなる形質転換体を培養し、培養物から組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼを採取してなる、組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼの製造方法を包含する。

【0060】本発明の形質転換体の培養に用いる栄養培地としては、炭素源、窒素源、無機物、及び必要に応じ使用菌株の必要とする微量栄養素を程よく含有するものであれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0061】炭素源としてはトレハロース、マルトース、スクロース、グルコース、フラクトース、デンプン、デキストリン、グリセリン等の炭化水素が用いられる。

【0062】窒素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、グルタミン酸などのアミノ酸、尿素等の無機有機窒素化合物が用いられる。窒素源としてはペプトン、ポリペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスティーブリカ、大豆粉、大豆粕、乾燥酵母、カザミノ酸、ソリュブルベジタブルプロテイン等の窒素含有天然物も使用できる。

【0063】無機物としてはリン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等が用いられる。その他にビオチン、チアミン等の微量栄養素を必要に応じて使用する。

【0064】培養法としては液体培養法（振とう培養法もしくは通気搅拌培養法）がよく、工業的には通気搅拌培養法が最も適している。培養温度とpHは、使用する形質転換体の増殖に最も適した条件を選べばよい。培養時間は培養条件によって変わってくるが、通常15～48時間程度であり、組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼの生成が確認されたとき、好ましくは生成が最大に達したときに培養を停止する。

【0065】この様にして得られた培養物から本発明の組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼを採取するには、まず、培養液中の菌体を物理的な手法で破碎するか、有機溶剤やリゾチームのような酵素によって溶解した後、残渣を遠心分離法や沪過法等により除去する。これを限外沪過、塩析、透析、溶剤沈澱等の処理を単独或いは組み合わせに付すことにより工業用途の濃縮酵素液が調製できる。

【0066】更に、この濃縮酵素液をイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、グル沪過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー等の周知の単離・精製法の組合せに付

すことにより、精製標品を得ることができる。

【0067】次に、本発明は、組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼと耐熱性マルトースホスホリーゼの存在下にマルトースとリン酸もしくはリン酸塩とを、水溶媒中で反応させることにより、トレハロース又はβ-グルコース-1-リン酸を製造する方法を包含する。

【0068】このように、本発明は、新規な好熱性バチルス属細菌、特にバチルス・ステアロサーモフィラスSK-1 (FERM P-14567) 由來の耐熱性トレハロースホスホリーゼ遺伝子を基に、遺伝子工学的手法により、組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼを得、これを用いて組換え微生物を作製したものであって、これを培養すれば、酵素の生産性が飛躍的に上昇し、不純物の少ない、高純度の組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼが調製できる点で極めて優れていると言える。

【0069】また、組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼが工業的規模で大量に、効率よく生産できるようになつた結果、これを利用することにより、有用なトレハロースの製造が飛躍的に効率よく製造することができる点においても、非常に価値がある。

【0070】以上、本発明は、本発明者らが先に見出した耐熱性トレハロースホスホリーゼについて遺伝子学的解明を行い、この解明を基に、そのDNAの遺伝子学的な特性を見つけ、遺伝子工学的な手法によって、高純度でしかも耐熱性という極めて有用な特性を有する組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼを効率よく製造できるDNAを得た点に、格別の意義があることが分かるであろう。

【0071】以下、本発明について詳細に説明する。

【0072】[1] 耐熱性トレハロースホスホリーゼの酵素化学的性質：本発明は、本発明者らによる、耐熱性トレハロースホスホリーゼの発見に基づくものであるが、この酵素は、好熱性バチルス属細菌、バチルス・ステアロサーモフィラスSK-1株から産生されたものであり、その酵素化学的特性を調べた結果（実施例1）、その酵素化学的性質は、以下のとおりであった。

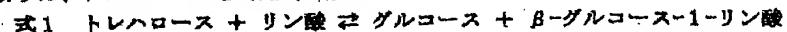
【0073】なお、トレハロースホスホリーゼ活性は、以下のように測定した。

【0074】酵素溶液0.4m1と0.5Mリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH6.0)0.06m1、2W/V%トレハロース0.6m1、蒸留水0.14m1を混合し、60℃、20分反応後10分間の煮沸によって反応を停止させた。次に、この反応停止液から0.02m1を採取し、グルコース検査試薬（グルコースCII-テストワコー；和光純薬工業（株））を3m1加え、室温で20分間反応させた後、505nmでの吸光度を分光光度計を用いて反応液中のグルコース量測定した。遊離した生成したグルコースの量から1分間に1μmolのトレハロースを加リン酸分解した酵素量を1単位とした。

【0075】また、ホスホリラーゼであることを確認するために、反応終了後の反応液を陰イオン交換カラムで分離後、示差屈折計を検出手段とする高速液体クロマトグラフィーにより $\beta$ -グルコース-1-リン酸を定量した。

【0076】(1) 作用

以下の式1で示すように、トレハロースを可逆的に加り



(2) 基質特異性

トレハロース、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、セロビオース、シュークロース、p-ニトロフェノール- $\alpha$ -グルコシド、p-ニトロフェノール- $\beta$ -グルコシドを基質として加リン酸分解反応を行ったところ、トレハロース以外にはグルコースの生成がほとんど認められなかった(表1)。

【表1】

基質特異性

基 質	相対活性 (%)
トレハロース	100
ネオトレハロース	1
マルトース	0
イソマルトース	1
セロビオース	0
シュークロース	1
p-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-グルコシド	0
p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコシド	0

(3) 至適温度

4.0 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH 6.0)中で各種温度(40~90°C)で反応させたところ、トレハロース加リン酸分解反応の至適温度は70°C~75°C付近で、60°C~75°Cの範囲で最高活性の約50%以上を示した(図1)。

【0077】(4) 熱安定性

1.0 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH 6.0)中にてインキュベートし、残存活性を測定したところ、65°Cで15分間処理で、無処理の95%以上の活性を示した(図2)。

【0078】(5) 至適pH

2.5 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH 4.0~7.7)と2.5 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.7~9.0)を用いて60°Cで反応を行ったところ、至適pHは6.5~7.5であった(図3)。

【0079】(6) pH安定性

1.00 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH 4.0~8.0)と1.00 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5~9.0)を用いて60°Cで24時間インキュベート

ン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でトレハロースに作用させると、等モルのグルコースと $\beta$ -グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースと $\beta$ -グルコース-1-リン酸に作用させると等モルのトレハロースとリン酸を生成する。

【化1】

し、各pHでの残存活性を測定したところ、pH 6.0~8.0で安定であった(図4)。

【0080】(7) 失活

100°C、10分間の加熱で100%失活する。

【0081】(8) 分子量

Superdex 200 pg(ファルマシアバイオテク(株))を用いたゲルエリートクロマトグラフィーにより、各種標準タンパク質との相対溶出保持時間から分子量を求めた結果、本酵素の分子量は11万~15万であった。

【0082】(9) 等電点

等電点電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から等電点は4.6~5.2であった。

【0083】(10) 阻害剤

1 mMのHgCl<sub>2</sub>で99%、ZnSO<sub>4</sub>で80%の活性阻害が見られた(表2)。

【表2】

阻害剤

阻害剤*	相対活性 (%)
FeCl <sub>3</sub>	95
MgCl <sub>2</sub>	102
MnSO <sub>4</sub>	110
CaCl <sub>2</sub>	100
Pb (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	93
Ba (OH) <sub>2</sub>	106
ZnSO <sub>4</sub>	20
CuSO <sub>4</sub>	91
HgCl <sub>2</sub>	1
EDTA-2Na	99
$\beta$ -メチルアントラジール	96
DTT	86
PCMB	0
無添加	100

\*1 mM

(11) N末端アミノ酸配列

常法により、アブライド・バイオシステムズ製気相プロテインシーケンサー「477A型」を使用して分析を行

ったところ、この酵素は、N末端に配列番号2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0084】[2] 耐熱性トレハロースホスホリーゼのDNAの配列解析

本発明者らは、上記の(11)のN末端アミノ酸配列に基づき、バチルス・ステアロサモフィラスSK-1株の染色体DNAから耐熱性トレハロースホスホリーゼをコードするDNAを取得し、その配列の解析を行った。

【0085】まず、バチルス・ステアロサモフィラスSK-1株の菌体よりアクロモペアチダーゼとSDSを用いた凍結融解法により染色体DNAを調製した。この染色体DNAをHindIII、BamHI、PstI、SalI、EcoRI等の制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動により分離し、ナイロン膜上にプロッティングした。一方、配列番号2に示すトレハロースホスホリーゼのN末端の8から13番目のアミノ酸配列に基づき、5'-CARYTNAAYAT HGARAA-3'で表される配列のオリゴヌクレオチドTN3を合成し、放射性同位元素<sup>32</sup>Pで標識し、これをプローブとして前記ナイロン膜上のDNA断片とサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、HindIIIで切断してできる断片中、約2.0k塩基対の断片がハイブリダイズすることが分かった。そこで、HindIIIで切断した染色体DNAからアガロースゲル電気泳動によって約2.0k塩基対のDNA断片を分画、抽出した。これをプラスミドベクターpUC118のHindIII部位に挿入し、大腸菌を形質転換した。得られた形質転換株からオリゴヌクレオチドTN3とハイブリダイズする組換えプラスミドを有するものを検索し、トレハロースホスホリーゼをコードするDNAの5'端DNA断片をクローニングした。

【0086】そして、この組換えプラスミド中の挿入された約2.0k塩基対の断片の塩基配列を蛍光ラベルを用いたダイアライマー法により決定した。

【0087】次に、この解析したDNA断片の塩基配列の3'側に制限酵素MspI認識配列が検出されたことから、このMspI認識配列から下流の塩基配列と相同性を示す、約2.0k塩基対のMspIで切断した染色体DNA断片をインバースPCR法によって解析した。2種類のDNA断片の塩基配列解析結果より、耐熱性トレハロースホスホリーゼをコードする全塩基配列を決定することができた。その配列を配列番号3に示す。

【0088】[3] 組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼのDNAの単離・同定とその製造：耐熱性トレハロースホスホリーゼの構造遺伝子を含むDNA断片の塩基配列が決定できることから、該トレハロースホスホリーゼをコードするDNA配列の開始コドン上流132塩基目からの配列5'-TTGAAAACAATCAGTTCAA-3'で表されるオリゴヌクレオチド5TP2と、終止コドン下流の配列で配列表における配列番号4の塩基番号162から

の配列のアンチセンス配列5'-TCGTGCGGCTTCCACCGATT-3'で表されるオリゴヌクレオチド3TP2をプライマーとして、前記の染色体DNAをテンプレートとしたPCRを行い、耐熱性トレハロースホスホリーゼ構造遺伝子を含む約3.3k塩基対のDNA断片を調製した。これをプラスミドベクターpCR2.1にライゲーションして、組換えプラスミドpSTP1を作製し、大腸菌INVαF<sup>+</sup>(endA1,recA1,hsdR17(r<sup>k</sup>,m<sup>k</sup>),supE44,λ-,thi-1,gyrA,relA1,φ80 lacZ△M15△(lacZYA-argF),deoR<sup>+</sup>,F<sup>+</sup>)株へ導入を行い、形質転換された大腸菌STP1を得た。

【0089】そして、上記の形質転換体中の組換えプラスミドpSTP1に挿入された3.3k塩基対のDNA断片中の構造遺伝子周辺の塩基配列の解析を行った。その結果は、配列番号1に示す通りであり、前記の耐熱性トレハロースホスホリーゼのDNA配列の配列番号3の塩基番号257～2796と一致することが確認された。

【0090】そこで、形質転換大腸菌STP1をジャーベー培養し、組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼ粗酵素の調製を行った。培養は、容量5lのファーメンターにポリペプトン1.6%、酵母エキス1%、NaCl 1.0%、MgSO<sub>4</sub> 0.05%を含有する培地(pH7.0)約3lを入れて滅菌後、予め滅菌したアンビシリン水溶液を100mg/lになるように添加し、温度を35°Cとした後、種培養液2V/V%を接種して、35°C、pH6.5～7.5に保持しながら24時間通気搅拌培養した。

【0091】培養終了後、培養液中の菌体破壊を行い、これを除去した粗酵素液を調製した。粗酵素液のトレハロースホスホリーゼ活性は3,000単位/m<sup>l</sup>であった。

【0092】更に、実施例3に示すとおり、この粗酵素を精製し、組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼの精製標品を得た。

【0093】本発明の組換え型耐熱性トレハロースホスホリーゼの性質は、以下の通りである。

【0094】(1) 作用

前記の式1で示すように、トレハロースを可逆的に加リソマルトース、マルトース、イソマルトース、セロビオース、シュークロース、p-ニトロフェノール-α-グルコシド、p-ニトロフェノール-β-グルコシドを基質として加リソマルトースを生成する。

【0095】(2) 基質特異性

トレハロース、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、セロビオース、シュークロース、p-ニトロフェノール-α-グルコシド、p-ニトロフェノール-β-グルコシドを基質として加リソマルトースを生成する。

んど認められなかった。

【0096】(3) 至適温度

4.0 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH 6.0)中で各種温度(4.0~9.0°C)で反応させたところ、トレハロース加リン酸分解反応の至適温度は7.0°C~7.5°C付近で、6.0°C~7.5°Cの範囲で最高活性の約50%以上を示した。

【0097】(4) 热安定性

1.0 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH 6.0)中にてインキュベートし、残存活性を測定したところ、6.5°Cで15分間処理で、無処理の95%以上の活性を示した。

【0098】(5) 至適pH

2.5 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH 4.0~7.7)と2.5 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.7~9.0)を用いて反応を行ったところ、至適pHは6.5~7.5であった。

【0099】(6) pH安定性

1.00 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH 4.0~8.0)と1.00 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5~9.0)を用いて6.0°Cで24時間インキュベートし、各pHでの残存活性を測定したところ、pH 6.0~8.0で安定であった。

【0100】(7) 失活

100°C、10分間の加熱で100%失活する。

【0101】(8) 分子量

Superdex 200 pg (ファルマシアバイオテク(株))を用いたゲルエロクロマトグラフィーにより、各種標準タンパク質との相対溶出容量から分子量を求めた結果、本酵素の分子量は11万~15万であった。

【0102】(9) 等電点

等電点電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から等電点は4.6~5.2であった。

【0103】(10) 阻害剤

1 mMのHgCl<sub>2</sub>で9.9%、ZnSO<sub>4</sub>で8.0%の活性阻害が見られた。

【0104】(11) N末端アミノ酸配列

常法により、アブライド・バイオシステムズ製気相プロテインシーケンサー「477A型」を使用して分析を行ったところ、精製酵素はN末端に配列番号2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0105】この組換え型耐熱性トレハロースホスホリーゼの酵素化学的特性は、バチルス・ステアロサーモフィラスSK-1の由来の耐熱性トレハロースホスホリーゼの酵素学的性質と一致するものであった。

【0106】従って、前述の組換え型耐熱性トレハロースホスホリーゼをコードするDNAは、バチルス・ステアロサーモフィラスSK-1の由来のものであると判断した。

【0107】(4) トレハロース又はβ-グルコース-1-リン酸の製造

組換え型耐熱性トレハロースホスホリーゼ及び耐熱性マルトースホスホリーゼの存在下に、マルトースとリン酸もしくはリン酸塩とを、水性媒体中で、反応させて、トレハロース又はβ-グルコース-1-リン酸を製造する方法について、以下述べる。

【0108】この反応に用いられる組換え型耐熱性トレハロースホスホリーゼとしては、pH 6.0の緩衝液、例えば1.0 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH 6.0)中で、5.0~7.0°Cのいずれかの温度で、好ましくは5.5~7.0°Cのいずれかの温度で、特に6.5°Cで15分処理後に無処理の95%以上の活性を有するものが好適に用いられる。これらの酵素は、精製酵素であっても、粗酵素であってもよい。また、さらにこれを酵素の常法により担体に固定した固定化酵素を用いることも可能である。

【0109】また、この反応に用いる耐熱性マルトースホスホリーゼとしては、上記反応温度のいずれかで、及び上記pH範囲のいずれかで、組換え型耐熱性トレハロースホスホリーゼの助力の下に、マルトースとリン酸もしくはリン酸塩からトレハロースを生産し得るもので、マルターゼ等のトレハロースの製造に悪影響を及ぼす酵素を含まないものであればよい。

【0110】しかしながら、好適にはpH 6.0の緩衝液、例えば1.0 mM酢酸緩衝液(pH 6.0)中で、5.0~6.5°Cのいずれかの温度で、好ましくは5.5~6.5°Cのいずれかの温度で、特に6.0°Cで15分処理後に無処理の80%以上の活性を有する耐熱性マルトースホスホリーゼを用いることができる。かかる性質を有する耐熱性マルトースホスホリーゼの例として、本発明者らによって見出されたバチルス・sp. RK-1 (FERM P-15044) が产生する耐熱性マルトースホスホリーゼを挙げることができる。

【0111】耐熱性マルトースホスホリーゼは組換え型耐熱性トレハロースホスホリーゼと同様、精製酵素であっても粗酵素であってもよい。

【0112】マルトースとしてはマルトースまたはマルトース含有物(例えばマルトース高含有糖液)を用いることができる。リン酸塩としてはリン酸三カリウム(もしくはナトリウム)、リン酸水素二カリウム(もしくはナトリウム)、リン酸二水素カリウム(もしくはナトリウム)等の水溶性リン酸塩を用いることができる。水性媒体としては水、緩衝液等が挙げられる。緩衝液としては酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液、トリス・塩酸緩衝液等を用いることができる。

【0113】酵素の使用量については特に制限はないが、マルトース1 gに対して各酵素とも、0.1~5.0単位、好ましくは1~20単位使用するのが好適である。

る。また、組換え型耐熱性トレハロースホスホリラーゼと耐熱性マルトースホスホラリーゼとの使用比率は特に制限ないが、単位の比で前者：後者=1:5~5:1、好ましくは1:2~2:1が適当である。

【0114】リン酸及び／またはリン酸塩はマルトースに対して、特に制限はないが、0.001~1倍モル、好ましくは0.005~0.5倍モル使用するのが適当である。尚、緩衝液がリン酸（塩）を含有する場合は系中のリン酸及びリン酸塩の総量が上記範囲であればよい。

【0115】上記反応は温度、雑菌汚染をさらに避けるとともに収率を挙げるため、好ましくは55~70°C、好ましくは55~65°C、更に好ましくは60~65°Cで行う。pHは一般に4.5~8.0、好ましくは5.0~6.0で行うのが適当である。上記条件で十分なトレハロース生成が見られた時点で反応を終了するが、反応は通常1~144時間で終了する。

【0116】反応終了後、反応液の加熱による酵素の失活、pHの低下（塩酸等の酸の添加）による酵素の失活等の適当な手段で反応を停止させ、活性炭処理、イオン交換樹脂処理、エタノール晶出処理等の単離・精製手段を適宜組み合わせてトレハロースを得ることができる。

【0117】また、本発明は、組換え型耐熱性トレハロースホスホリラーゼの存在下にトレハロースとリン酸もしくはリン酸塩とを、水溶媒中で反応させせて、 $\beta$ -グルコース-1-リン酸を製造することもできる。

【0118】その場合、この反応に用いられる組換え型耐熱性トレハロースホスホリラーゼ、トレハロース、水溶媒は、トレハロース製造の場合と同様にして行うことができる。酵素はマルトース1gに対して0.1~5.0単位、好ましくは1~2.0単位が好適である。

【0119】反応温度、反応pH、反応時間はトレハロース製造の場合と同様にして行うことができる。反応終了後、イオン交換樹脂処理等の単離・精製手段を適宜組み合わせて $\beta$ -グルコース-1-リン酸を得ることができる。

#### 【0120】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を実施例により詳細に説明する。

【0121】トレハロースホスホリラーゼ活性は、以下のように測定した。

【0122】適宜希釈した酵素溶液0.4mlと0.5Mリン酸クエン酸緩衝液（pH6.0）0.06ml、2W/V%トレハロース0.6ml、蒸留水0.14mlを混合し、60°C、20分反応後10分間の煮沸によって反応を停止させた。次に、この反応停止液から0.02mlを採取し、グルコース検査試薬グルコースCII-テストワコ（和光純薬工業（株））を3ml加え、室温で20分間反応させた後、505nmでの吸光度を分光光度計を用いて測定し、反応液中のグルコース量を定量し

た。生成したグルコースの量から1分間に1 $\mu$ molのトレハロースを加リン酸分解した酵素量を1単位とした。

#### 【0123】

【実施例1】 精製トレハロースホスホリラーゼの酵素化学的特性

#### 【実施例1-1】 精製酵素の調製

バチルス・ステアロサモフィラスSK-1（FERM P-14567）による耐熱性トレハロースホスホリラーゼの精製は以下のようにして行った。

【0124】（培養）酵母エキス1%、ポリペアトン2%、トレハロース1%を含有する培地（pH7.0）100mlを500mlバッフル付きマイヤーフラスコに入れ、121°C、20分間オートクレーブ殺菌したものに、バチルス・ステアロサモフィラスSK-1を1白金耳植菌し、55°Cにて16時間振とう培養したものを種培養液とした。

【0125】容量5lのファーメンターに種培養の場合と同組成の培地約3lを入れて滅菌し、温度を55°Cとした後、種培養液2V/V%を接種し、55°C、pH6.0~7.0に保持しながら18時間通気搅拌培養した。

【0126】（粗酵素調製）分離した培養液に硫酸を40~60%の飽和溶液になるよう溶解し、生じたタンパク質の沈澱を遠心分離によって回収して、10mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液（pH6.0）に溶解後、同じ緩衝液に対して透析を行い、透析後トレハロースホスホリラーゼ活性350単位/mlの粗酵素液を10mlを得た。

【0127】（イオン交換クロマトグラフィー）10mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液（pH6.0）によって平衡化したTSK gel DEAEトーヨーパール6.5cm（東ソー（株））を詰めたカラムに、粗酵素液を添加し、5カラム容量の0~0.4M NaClの上昇濃度勾配によって溶出し、分画分取した。活性のある画分は合わせて濃縮、脱塩後、更に、一連の同じクロマトグラフィー操作を行い精製度を上げた。

【0128】（疎水クロマトグラフィー）40%飽和となるように硫酸アンモニウムを溶解した10mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液（pH6.0）によって平衡化した、TSK gel Phenylトーヨーパール6.5cm（東ソー（株））を詰めたカラムに、上記部分精製酵素液を添加し、8カラム容量の40%~0%飽和硫酸アンモニウム溶液の下降濃度勾配によって溶出し、分画分取した。活性のある画分を合わせて濃縮、脱塩を行った。

【0129】（吸着クロマトグラフィー）0.3mMとなるようにCaCl<sub>2</sub>を溶解した10mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液（pH6.0）によって平衡化した、PENTAX GH-0810Mカラムに、上記部

分精製酵素液を添加し、10カラム容量の10~300 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH6.0)の上昇濃度勾配によって溶出し、分画分取した。活性のある画分を合わせて濃縮、脱塩を行った。

【0130】(ゲル済過クロマトグラフィー) 0.2M NaClを溶解した10 mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH6.0)によって平衡化した、Superdex 200 pgカラム(ファルマシアバイオテク(株))に、上記部分精製酵素液を添加し、同じ緩衝液で溶出し、分画分取した。活性のある画分を合わせて濃縮、脱塩を行った。

【0131】(ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動) 上記精製酵素をネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動し、ゲルをCBB染色してタンパク質のバンドを調べたところ一本のバンドしか検出されず、単一タンパク質であることが確認できたので精製トレハロースホスホリラーゼ酵素液とした。

【0132】[実施例1-2] 精製酵素の酵素化学的特性

実施例1-1で調製した精製トレハロースホスホリラーゼ液を用い、以下の酵素化学的特性を調べた。

【0133】(1) 作用

実施例1-1で調製した精製酵素液0.4m1と0.5M リン酸クエン酸緩衝液(pH6.0)0.06m1、2W/V%トレハロース0.6m1、蒸留水0.14m1を混合し、60°C、60分間トレハロース分解反応を行った。反応後10分間の煮沸によって反応を停止させ、この反応停止液から0.02m1を採取し、グルコース検査試薬グルコースCII-テストワコ(和光純薬工業(株))を3m1加え、室温で20分間反応させた後、505nmでの吸光度を分光光度計を用いて測定し、反応液中のグルコース量を定量した。一方、反応停止液を陰イオン交換カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分離後、示差屈折計でβ-グルコース-1-リン酸を検出し定量した。その結果、反応停止液中のグルコース含量とβ-グルコース-1-リン酸含量は等しかった。

【0134】また、精製酵素液0.4m1と0.5M酢酸緩衝液(pH6.0)0.12m1、0.5Mβ-グルコース-1-リン酸・Na水溶液0.12m1、0.5Mグルコース水溶液0.12m1、蒸留水0.44m1を混合し、60°C、60分反応後10分間の煮沸によって反応を停止させた。次に、この反応停止液から0.02m1を採取し、グルコース検査試薬グルコースCII-テストワコ(和光純薬工業(株))を3m1加え、室温で20分間反応させた後、505nmでの吸光度を分光光度計を用いて測定し、反応液中のグルコース量を定量した。一方、反応停止液をTSKgel Amido 80カラム(東ソー(株))を用いた高速液体クロマトグラフィーで分離後、示差屈折計で反応液のトレハロースを

検出し定量した。

【0135】その結果、反応停止液中の消費グルコース量と生成トレハロース量は等しかった。従って、精製酵素の作用は、式(1)で示すように、トレハロースを可逆的に加リン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でトレハロースに作用させると、等モルのグルコースとβ-グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースとβ-グルコース-1-リン酸に作用させると等モルのトレハロースとリン酸を生成すると結論した。

【0136】(2) 基質特異性

(1)のトレハロース分解反応の基質を以下のものに置き換えて加リン酸分解反応を行ったところ、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、セロビオース、シュークロース、p-ニトロフェノール-α-グルコシド、p-ニトロフェノール-β-グルコシドを基質として加リン酸分解反応を行ったところ、いずれもグルコースの生成が認められなかった(表1)。

【0137】(3) 至適温度

精製トレハロースホスホリラーゼ活性を各種温度(40~90°C)で行ったところ、トレハロース加リン酸分解反応の至適温度は70°C~75°C付近で、60°C~75°Cの範囲で最高活性の約50%以上を示した(図1)。

【0138】(4) 熱安定性

精製酵素液を各種温度(40~90°C)に15分間インキュベートした後、トレハロースホスホリラーゼ活性を測定したところ、65°C処理で、無処理の95%以上の活性を示した(図2)。

【0139】(5) 至適pH

トレハロースホスホリラーゼ活性測定に用いる0.5M リン酸クエン酸緩衝液(pH6.0)の代わりに0.5M リン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH4.0~7.7)もしくは0.5Mトリス塩酸緩衝液(pH7.7~9.0)を用いて反応を行ったところ、至適pHは6.5~7.5であった(図3)。

【0140】(6) pH安定性

精製トレハロースホスホリラーゼ酵素液を100mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH4.0~8.0)と100mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)と混合し、60°Cで24時間インキュベートした後、各pHでの残存活性を測定したところ、pH6.0~8.0で安定であった(図4)。

【0141】(7) 失活

精製トレハロースホスホリラーゼ酵素液を100°C、10分間加熱した後、残存活性を測定したところ、活性は100%失活していた。

【0142】(8) 分子量

Superdex 200 pg(ファルマシアバイオテク(株))を用いたゲル済過クロマトグラフィーにより、各種標準タンパク質との相対溶出容量から分子量を求めた結果、精製酵素の分子量は11万~15万であつ

た。

【0143】(9) 等電点

等電点電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から等電点は4.6～5.2であった。

【0144】(10) 阻害剤

精製トレハロースホスホリーゼ酵素液に終濃度1 mM になるように阻害剤を添加した後、残存活性を測定したところ、HgCl<sub>2</sub>で99%、ZnSO<sub>4</sub>で80%の活性阻害が見られた(表2)。

【0145】(11) N末端アミノ酸配列

常法により、アプライド・バイオシステムズ製気相プロテインシーケンサー「477A型」を使用して分析を行ったところ、精製酵素はN末端に配列番号2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0146】

【実施例2】 耐熱性トレハロースホスホリーゼをコードするDNAを含む組換えDNA及び組換えDNA形質転換大腸菌の調製

【実施例2-1】 染色体DNAの調製

ポリペプトン2%、酵母エキス1%を含有する培地(pH7.0)5m1を試験管に入れ、121°C、20分間オートクレーブ殺菌したものにバチス・ステアロサモフィラスSK-1株を植菌し、55°Cで14時間振とう培養した。これを種菌液とし、同じ培地100m1を500m1バッフル付フラスコに入れ、121°C、20分間オートクレーブ殺菌したものに5%植菌し、55°Cで6時間回転振とう培養した。遠心分離により培養液から菌体を分離し、0.1M EDTAを含む0.15M NaCl溶液(pH8.0)に懸濁した。これにアクロモペアチダーゼ(和光純薬(株))を4mg/m1となるように加え、37°Cで20分間程やかに振とうした後、-80°Cで30分間凍結した。解凍後、1%SDSと0.1M NaClを含む0.1Mトリス・塩酸緩衝液(pH9.0)を加えて60°Cに加温した。冷却後、1mM EDTAを含む10mMトリス・塩酸緩衝液(pH8.0)(TE緩衝液)で飽和したフェノール溶液を加えて除蛋白処理を行った。その後、冷エタノールを加え、生成した粗染色体DNAを採取し、これを70%、80%、90%エタノールにそれぞれ5分間ずつ浸した後、TE緩衝液に溶解した。これにRNaseA(シグマ)を20μg/m1となるように加え、37°Cで30分間反応させた。反応液を再度フェノール溶液による除蛋白処理を行い、冷エタノールを加えて生成した染色体DNAを採取し、70%、80%、90%エタノールにそれぞれ5分間ずつ浸した後、1mg/m1となるようにTE緩衝液に溶解し、染色体DNA溶液とした。

【0147】【実施例2-2】 トレハロースホスホリーゼをコードするDNAの5'端DNA断片の取得  
実施例2-1で調製した染色体DNAをHindIII、BamH I、PstI、SalI、EcoRI等の各種制限酵素で切断し、アガ

ロースゲル電気泳動を行った。分離したDNA断片を常法によりナイロン膜Gene Screen Plus

Hybridization Transfer Membrane(デュポン)に固定した。一方、配列表における配列番号2に示すトレハロースホスホリーゼのN末端の8から13番目のアミノ酸配列のGln-Leu-Asn-Ile-Glu-Asnで表される配列に基づき、5'-CARYTNAAYATHGARAA-3'で表される配列のオリゴヌクレオチドTN3を化学合成した。このオリゴヌクレオチドTN3を放射性同位体<sup>32</sup>Pで標識後、前記ナイロン膜上に固定したDNA断片とSouthern, E.M.らの方法(J. Mol. Biol., 98:503-517, 1975)に従ってサザンハイブリダイゼーションを行った。

【0148】このときのハイブリダイゼーションの条件は、5XSSC、1%SDS、10%硫酸デキストリン、0.5mg/m1サケ変性DNAからなる溶液中において42°Cで16～20時間ハイブリダイズを行い、その後2XSSC、1%SDSからなる溶液中にて55°Cで30分間のサイクルで3回ナイロン膜を洗浄した。

【0149】その結果、制限酵素HindIIIで切断した約2.0k塩基対のDNA断片がハイブリダイズした。そこでHindIIIで切断した染色体DNAを再度アガロースゲル電気泳動し、約2.0k塩基対のDNA断片をDE81ペーパー(ワットマン)を用いて抽出した。抽出したDNA断片をプラスミドベクターpUC118のHindIII部位に挿入した。この組換えプラスミドをコンピメントセルE.coli JM109(宝酒造(株))10<sup>8</sup>μlに加え、氷冷下に30分静置後、42°Cで45秒間加温し、SOC培地を加えて37°Cで1時間振とう培養することにより、組換えプラスミドを導入した形質転換大腸菌を得た。得られたそれぞれの形質転換体からアルカリ-SDS法により組換えプラスミドを回収し、HindIIIで切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、DNA断片を前述と同様にナイロン膜上に固定した。ナイロン膜上に固定したDNAは<sup>32</sup>Pで標識したTN3をプローブとして前述と同様の条件でサザンハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズする組換えプラスミドを選択し、2.0k塩基対のHindIII断片をクローン化した。

【0150】この選択した組換えプラスミドをHindIIIで切断後、アガロースゲル電気泳動を行い、挿入された約2.0k塩基対の染色体DNA断片をDE81ペーパーを用いて抽出した。抽出したDNA断片は超音波処理によって0.5kから1.0k塩基対の大きさに小断片化した後、RTG pUC18 SmaI/BAP+Ligase(ファルマシア)を用いてプラスミドベクターpUC18のSmaI部位に挿入した。そして、この組換えプラスミドをコンピメントセルE.coli 109(宝酒造(株))を用いて大腸菌JM109に導入した。得られた大腸菌から組換えプラスミドを抽出し、このプラス

ミドをテンプレート、2種類の合成オリゴヌクレオチドF P (5'-GTTTCCCCAGTCACGACG-3') 及びR P (5'-GAATTGAGCGGATAAC-3') をプライマーとしてPCRを行い、pUC18に挿入したDNA断片の増幅を行った。反応条件は、93°Cで2分間加熱した後、95°Cで1分、55°Cで1分30秒、72°Cで3分のサイクルを30回繰り返してから、最後に72°Cで15分保温した。反応液90μlにPEG溶液(20%ポリエチレンリゴール、2.5M NaCl)を60μl加えて混合し、氷中に15分間静置した。遠心分離により沈殿したDNA断片を分離し、70%エタノールで洗浄後、真空乾燥した。これを適量の蒸留水に溶解し、塩基配列決定用DNAを調製した。このDNAをテンプレートとし、PRI SM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction kit (パーキンエルマー)を用いたジオキシ・チーン・ターミネーター法により、DNA断片の蛍光ラベルを行い、DNAシークエンサー373A (Applied Biosystems)で分析して塩基配列を決定した。決定した全ての塩基配列をコンピューターソフトGENETYX-MAC (ソフトウエア-開発(株))を用いて解析し、2.0k塩基対のDNA断片の塩基配列を決定した。結果、この断片は、トレハロースホスホリラーゼ遺伝子のアロモーター及び構造遺伝子の途中までを含む1,956塩基対のDNA断片であることが判明した。

【0151】[実施例2-3] 耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードするDNAの3'端DNA断片の取得

実施例2-2で決定した配列に制限酵素Msp I 認識配列が見られたことから、染色体DNAをMsp Iで切断し、アガロース電気泳動後、ナイロン膜上に固定した。次に、実施例2-2でクローン化した2.0k塩基対のHindIII切断DNA断片を更にMsp Iで切断し、約0.2k塩基対のDNA断片を調製し、これをRandom Primer DNA Labeling Kit (宝酒造(株))を用いたランダムプライマー-DNAラベリング法により放射性同位体<sup>32</sup>Pで標識し、前記ナイロン膜上に固定したDNA断片とサザンハイブリダイゼーションを行った。

【0152】このときのハイブリダイゼーションの条件は、5XSSC、1%SDS、10%硫酸デキストリン、0.5mg/mlサケ変性DNAからなる溶液において65°Cで16~20時間ハイブリダイズを行い、その後2XSSC、1%SDSからなる溶液中にて65°Cで30分間のサイクルで3回ナイロン膜を洗浄した。結果、2.0k塩基対のDNA断片がハイブリダイズした。

【0153】そこで、実施例2-2で決定した配列のMsp I 認識配列以降の塩基配列を基に、5'-TGTGCTTGCCATCA

CGTTCGTGTA-3'及び5'-ATTTGCGCTGGGCAGCCAAAGCTGT-3'で表されるオリゴヌクレオチドTL及びTRを化学合成し、一方、実施例2-1で調製した染色体DNAを制限酵素Msp Iで切断した後、DNA Ligation Kit (宝酒造(株))を用いてライゲーションを行い、このDNAをテンプレート、TL及びTRをプライマーとしてAmpliTaq DNA Polymerase (パーキンエルマー)を用いてインバースPCRを行った。反応条件は、95°Cで3分間加熱後、95°Cで30秒間、65°Cで8分間のサイクルを32回繰り返してから、最後に72°Cで12分間保温した。反応液をアガロースゲル電気泳動したところ、約2.0k塩基対のDNA断片が検出されたので、アガロースゲルよりこのDNA断片をDE81ペーパー(ワットマン)を用いて抽出した。抽出したDNA断片は超音波処理によって0.5から1.0k塩基対の大きさに小断片化した後、RTG pUC18 SmaI/BAP+Ligase (ファルマシア)を用いてプラスミドベクターpUC18のSmaI部位に挿入した。そして、この組換えプラスミドをコンピントセル E.coli JM109 (宝酒造(株))を用いて大腸菌JM109に導入した。得られた形質転換大腸菌から組換えプラスミドを抽出し、このプラスミドをテンプレート、オリゴヌクレオチドFP及びRPをプライマーとしてPCRを行った。反応液から増幅したDNA断片を精製し、塩基配列決定用DNAを調製した。そして、このDNA断片をテンプレートとしてPRI SM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (パーキンエルマー)を用いた蛍光ラベル反応を行い、DNAシークエンサー373A (Applied Biosystems)で分析して塩基配列を決定した。決定した全ての塩基配列をコンピューターソフトGENETYX-MAC (ソフトウエア-開発(株))を用いて解析し、トレハロースホスホリラーゼをコードするDNAの3'端を含む919塩基対とその下流に存在する340塩基対の配列を決定した。919塩基対の配列と実施例2-2で決定した配列と合わせることによって耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードするDNAの配列が決定できた。決定したトレハロースホスホリラーゼをコードする塩基配列を配列表における配列番号3に示す。また、終始コドンから下流にある340塩基対の配列を配列表における配列番号4に示す。

【0154】[実施例2-4] 組換えプラスミドpSTP1と形質転換大腸菌STP1の調製

実施例2-3で決定した塩基配列より、トレハロースホスホリラーゼをコードするDNA配列の開始コドン上流132塩基目からの配列5'-TTGAAAACAAATCAGTTCAA-3'で表されるオリゴヌクレオチド5TP2と、終止コドン下流の配列で配列表における配列番号4の塩基番号162からの配列のアンチセンス配列5'-TGTGCGCTTCCACCGAT

T-3'で表されるオリゴヌクレオチド3TP2を化学合成した。実施例2-1で調製した染色体DNAをテンプレートとし、5TP2と3TP2をプライマーとしてPCRを行い、3.3k塩基対のDNA断片を得た。

【0155】この3.3k塩基対のDNA断片を、Original TA Cloning Kit (Invitrogen)を用いて、プラスミドベクターpCR2.1にライゲーション後、大腸菌INVαF' (endA1, recA1, hsdR 17(r<sup>k</sup>, m<sup>k</sup>), supE44, λ-, thi-1, gyrA, relA1, ϕ80 lacZ ΔM15Δ(lacZYA-argF), deoR<sup>r</sup>, F')株への導入を行い、3.3k塩基対のDNA断片が組み込まれた組換えプラスミドpSTP1(図5)を有する形質転換大腸菌STP1を得た。

【0156】上記の形質転換大腸菌STP1をEscherichia coli STP1と命名し(受託番号: FERM P-16162)、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成9年3月27日に寄託した。

【0157】そして、形質転換大腸菌STP1を培養し、培養液から組換えプラスミドpSTP1を抽出し、挿入した約3.3k塩基対のDNA断片の5'側から2686塩基までの配列の解析を行った。その塩基配列を、配列表の配列番号1に示す。

【0158】この配列は、実施例2-3で決定した耐熱性トレハロースホスホリラーゼのDNA配列の配列番号3の塩基番号257~2796と一致することが判明し、組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼをコードしていることが確認できた。

【0159】

【実施例3】形質転換大腸菌STP1が生産する組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼの酵素化学的特性

【実施例3-1】組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼの精製

バクトリアント1.6%、酵母エキス1.0%、NaC 10.5%を含有する培地(pH7.0)100mlを500ml三角フラスコに入れ、121℃、20分間オートクレーブ殺菌した後、沪過滅菌した10mg/mlアンピシリン水溶液0.5mlを添加した後に、実施例2で得られた形質転換大腸菌STP1を1白金耳植菌し、37℃で16時間回転振とう培養したものを種培養液とした。

【0160】容量5lのファーメンターに種培養と同組成の培地(pH7.0)約3lを入れて滅菌後、予め沪過滅菌したアンピシリン水溶液を100mg/lになるように添加し、温度を35℃とした後、種培養液2V/V%を接種して、35℃、pH6.5~7.5に保持しながら24時間通気搅拌培養した。

【0161】培養終了後、培養液を連続的に超音波処理して菌体の破壊を行った。これを遠心分離し菌体残渣を除去した培養液上清を得た。この上清を限外沪過によって約100mlまで濃縮した後、10mM酢酸緩衝液

(pH6.0)を3l加えて、再度100mlまで濃縮し、粗酵素液を得た。粗酵素液のトレハロースホスホリラーゼ活性は3,000単位/mlであった。

【0162】次に、この粗酵素液を実施例1-1と同様にして精製を行い、ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一タンパク質であることを確認した。

【0163】【実施例3-2】組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼの酵素化学的特性

実施例3-1の精製した組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼの酵素化学的特性は実施例1-2と同様にして調べた。以下に結果を示す。

【0164】(1)作用

トレハロースを可逆的に加リン酸分解する。すなわち、リン酸存在下でトレハロースに作用させると、等モルのグルコースとβ-グルコース-1-リン酸を生成し、グルコースとβ-グルコース-1-リン酸に作用させると等モルのトレハロースとリン酸を生成する。

【0165】(2)基質特異性

トレハロース、ネオトレハロース、マルトース、イソマルトース、セロビオース、シュークロース、p-ニトロフェノール-α-グルコシド、p-ニトロフェノール-β-グルコシドを基質として加リン酸分解反応を行ったところ、トレハロース以外にはグルコースの生成が認められなかった。

【0166】(3)至適温度

40mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH6.0)中で各種温度(40~90℃)で反応させたところ、トレハロース加リン酸分解反応の至適温度は70℃~75℃付近で、60℃~75℃の範囲で最高活性の約50%以上を示した。

【0167】(4)熱安定性

10mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH6.0)中にてインキュベートし、残存活性を測定したところ、65℃で15分間処理で、無処理の95%以上の活性を示した。

【0168】(5)至適pH

25mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH4.0~7.7)と25mMトリス・塩酸緩衝液(pH7.7~9.0)を用いて60℃で反応を行ったところ、至適pHは6.5~7.5であった。

【0169】(6)pH安定性

100mMリン酸カリウム・クエン酸緩衝液(pH4.0~8.0)と100mMトリス・塩酸緩衝液(pH7.5~9.0)を用いて60℃で24時間インキュベートし、各pHでの残存活性を測定したところ、pH6.0~8.0で安定であった。

【0170】(7)失活

100℃、10分間の加熱で100%失活した。

【0171】(8)分子量

Superdex 200 pg (ファルマシアバイオテ

ク(株))を用いたゲル沪過クロマトグラフィーにより、各種標準タンパク質との相対溶出容量から分子量を求めた結果、本酵素の分子量は11万～15万であった。

【0172】(9)等電点

等電点電気泳動により、各種標準タンパク質との相対移動度から等電点は4.6～5.2であった。

【0173】(10)阻害剤

1 mMのHgCl<sub>2</sub>で99%、ZnSO<sub>4</sub>で80%の活性阻害が見られた。

【0174】(11)N末端アミノ酸配列

常法により、アプライド・バイオシステムズ製気相プロテインシーケンサー「477A型」を使用して分析を行ったところ、精製酵素はN末端に配列リストにおける配列番号2に示すアミノ酸配列を有していた。

【0175】この結果から、組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼは、耐熱性トレハロースホスホリラーゼと同じ酵素化学的性質を有することが確認された。

【0176】

【実施例4】組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼを用いたトレハロースの製造

【実施例4-1】耐熱性マルトースホスホリラーゼの調製

酵母エキス1%、ポリペプトン2%、マルトース1%を含有する培地(pH7.0)100mLを500mLバッフル付きマイヤーフラスコに入れ、121°C、20分間オートクレーブ殺菌したものに、バチルスsp.RK-1(FERM P-15044)を1白金耳植菌し、55°Cにて16時間振とう培養したものを種培養液とした。

【0177】容量5Lのファーメンターに酵母エキス1%、ポリペプトン2%、マルトース1%を含有する培地(pH7.0)約3Lを入れて滅菌し、温度を55°Cとした後、種培養液2V/V%を接種し、55°C、pH6.0～7.0に保持しながら40時間通気搅拌培養した。

【0178】培養終了後、培養物を遠心分離により菌体を分離し、上清に硫安を80%飽和に溶解し、析出したタンパク質を遠心分離によって集めた。これを1.0 mM酢酸緩衝液(pH6.0)に溶解後、同じ緩衝液に対して透析を行い、濃縮後約200単位/mL粗酵素液を20mL得た。

【0179】【実施例4-2】マルトースからトレハロースの生成反応

実施例4-1で調製した耐熱性マルトースホスホリラーゼ粗酵素液と実施例3-1で調製した組換え型トレハロースホスホリラーゼ粗酵素液を用いて、基質のマルトースに作用させトレハロースへ変換させた。

【0180】反応液はマルトース濃度30W/W%、リン酸濃度1.0 mM、粗酵素各10単位/gとなるように

添加し、酢酸緩衝液でpH5.0に調製した。反応は60°Cで48時間行った。反応の停止は10分間100°Cに加熱して行った。反応終了後、各反応液をTSKgel Amido 80カラム(東ソー(株))、溶離液アセトニトリル/水(76/24)、流速0.8mL/min、カラム温度80°C、示差屈折計Shodex(昭和電工(株))を検出手段とする高速液体クロマトグラフィーにより反応液の糖組成を定量した。また、β-グルコース-1-リン酸は反応液を陰イオン交換カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーにより定量した。

【0181】結果、基質マルトースの65%がトレハロースに変換された。

【0182】

【実施例5】トレハロース含有糖液、及びその粉末の製造

コーンスターにα-アミラーゼを作用させた澱粉液化液に枝切り酵素プロモザイム(ノボノルディクスバイオインダストリー)とβ-アミラーゼ(長瀬産業(株))を作用させて調製したマルトース高含有糖液(固体分30W/W%、固体分当たりのマルトース純度80%)に、実施例4-1で調製した組換え型トレハロースホスホリラーゼ粗酵素液と実施例4-2で調製したバチルスsp.RK-1(FERM P-15044)の耐熱性マルトースホスホリラーゼ粗酵素液をそれぞれ固体分1.0g当たり10単位になるように加え、さらに、リン酸濃度1.0 mMになるようにリン酸カリウムを加えて、60°C、pH5.0で48時間反応させ、次いで100°Cで10分間加熱して酵素を失活させた。

【0183】この反応液を活性炭で脱色し、イオン交換樹脂で脱塩した後、濃度約7.5%まで濃縮し、トレハロース含有糖液を得た。この糖液を実施例4-3と同様に高速液体クロマトグラフィーによって分析した結果、固体分当たりの割合はグルコース2.8%、トレハロース63.2%、マルトース20.5%、マルトリオース5.1%、その他マルトオリゴ糖8.4%であった。

【0184】また、前記反応液に固体分1g当たり1単位になるようにグルコアミラーゼ(生化学工業(株))を加え、55°Cで8時間反応させ、次いで100°Cで10分間加熱して酵素を失活させた。この反応液を活性炭で脱色し、イオン交換樹脂で脱塩した後、濃度約5.0%まで濃縮し、ナトリウム型イオン交換カラムで分離を行い、トレハロース画分を分取した。この分取した糖液を濃縮し、固体分7.5%で固体分当たり9.5%のトレハロースを含有するトレハロース高含有糖液を得た。

【0185】さらに、このトレハロース高含有糖液を濃縮後乾燥することにより粉末トレハロースを得た。

【0186】以上の結果から、組換え耐熱性トレハロースホスホリラーゼを利用して、トレハロースを製造することが出来ることが確認された。

【0187】

【発明の効果】本発明は、本発明者らが見出した、好熱性バチルス属細菌、特にバチルスステアローサーモフィラスSK-1 (FERM P-14567) 由來の耐熱性トレハロースホスホリーゼ遺伝子を基に、遺伝子工学的手法により、組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼを得、これを用いて組換え微生物を作製したものであって、これを培養すれば、酵素の生産性が飛躍的に上昇し、不純物の少ない、高純度組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼを効率よく製造できるDNAを得た点で極めて優れている。

【0188】また、このように、組換え耐熱性トレハロースホスホリーゼが工業的規模で大量に、効率よく生産できるようになった結果、これを利用することにより、有用なトレハロースの製造が飛躍的に効率よく製造することができる点においても、非常に価値がある。

【0189】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2686

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：バチルス・ステアローサーモフィラス

株名：SK-1

配列の特徴

特徴を示す記号：5' UTR

存在位置：1.. 278

特徴を決定した方法：E

特徴を示す記号：CDS

存在位置：279.. 2573

特徴を決定した方法：E

特徴を示す記号：3' UTR

存在位置：2574.. 2686

特徴を決定した方法：E

配列

TTCCGAAAGA TTTTACTGTA CCATATGATT GGATGGTAA CTATACTCTT CTTTATCATT	60		
CGAAAAAATG TAAGCCATT CAAATGATA GTTGTGAC TCTAGTTGT AAAAATCAT	120		
AAAGGAGTTC TTTTTGGGC TCAAGGTTGA AAACAAATCA GTTCAATCAT ATGCTGCTAT	180		
CGTTCTGACA CTTTGATTG TGCTGATTTC CCAGATATA ATCGTATCAG AATCAACATC	240		
CGTCAGAGTA AAAGAATAAT GAAACAGGAG TGTCTTAC ATG TCT TGG TCA ATT AGC	296		
Met Ser Trp Ser Ile Ser			
1	5		
TCC AAT CAG CTT AAT ATT GAA AAC TTG TTA AAT GAA GAA AGT CTC TTT	344		
Ser Asn Gln Leu Asn Ile Glu Asn Leu Leu Asn Glu Glu Ser Leu Phe			
10	15	20	
TTC ACT GGT AAT GGG TAT ATT GGT GTA CGT GGA AAT TTC GAA GAA AAA	392		
Phe Thr Gly Asn Gly Tyr Ile Glu Val Arg Gly Asn Phe Glu Glu Lys			
25	30	35	
TAT TAT GAT GGT GCT TCG TCA ATT CGC GGT ACA TAT ATC AAT GCA TTC	440		
Tyr Tyr Asp Gly Ala Ser Ser Ile Arg Gly Thr Tyr Ile Asn Ala Phe			
40	45	50	
CAC GAT ATA ACT GAT ATT AAC TAC GGT GAA AAA TTA TAT GCA TTC CCT	488		
His Asp Ile Thr Asp Ile Asn Tyr Gly Glu Lys Leu Tyr Ala Phe Pro			
55	60	65	70
GAA ACG CAA CAG AAG TTA GTG AAT GTC ATT GAT GCG CAA ACT GTT CAA	536		
Glu Thr Gln Gin Lys Leu Val Asn Val Ile Asp Ala Gln Thr Val Gln			
75	80	85	
ATA TAC TTT GGA GAA GAA GAA AGG TTT TCG CTT TTT GAA GGA GAA	584		
Ile Tyr Phe Gly Glu Glu Glu Arg Phe Ser Leu Phe Glu Gly Glu			
90	95	100	
GTC ATT CAA TAT GAA CGG CAT CTC CAT ATG GAC AAA GGC TTT TCA GAA	632		
Val Ile Gln Tyr Glu Arg His Leu His Met Asp Lys Gly Phe Ser Glu			
105	110	115	
CGT GTG ATT CAT TGG CGT TCT CCT GGA GGA AAA GAA GTC AAA CTC AAG	680		
Arg Val Ile His Trp Arg Ser Pro Gly Gly Lys Glu Val Lys Leu Lys			
120	125	130	

TTT AAA AGG TTA ACT TCA TTC ATT TAT AAA GAA CTT TTC ATA CAG GAA	728
Phe Lys Arg Leu Thr Ser Phe Ile Tyr Lys Glu Leu Phe Ile Gin Glu	
135 140 145 150	
ATT ACA ATT GAA CCC GTT AAT TTT TTT GGG AAA ACG AAG GTG GTT TCC	776
Ile Thr Ile Glu Pro Val Asn Phe Phe Gly Lys Thr Lys Val Val Ser	
155 160 165	
ACA GTP AAC GGA GAT GTC TCA AAT TTT GTT GAT CCA AGT GAT CCA CGG	824
Thr Val Asn Gly Asp Val Ser Asn Phe Val Asp Pro Ser Asp Pro Arg	
170 175 180	
GTC GGT TCA GGA CAT GCG AAG CTC TTG ACA GTC TCG GAT ACG GTT ATT	872
Val Gly Ser Gly His Ala Lys Leu Leu Thr Val Ser Asp Thr Val Ile	
185 190 195	
GAA GGG GAT TTT GTT AGT ATA GAA ACA AAA ACG AAA CGG TCA AAT CTT	920
Glu Gly Asp Phe Val Ser Ile Glu Thr Lys Thr Lys Arg Ser Asn Leu	
200 205 210	
TAT GCC GCT TGT ACA TCA ACA TGC AGA CTA AAC ATT GAT TTT CAG CGA	968
Tyr Ala Ala Cys Thr Ser Thr Cys Arg Leu Asn Ile Asp Phe Gin Arg	
215 220 225 230	
GAA TAT GTT AAA AAT GAG AAG TCG GTT GAA ACT GTA CTC ACT TTT GAA	1016
Glu Tyr Val Lys Asn Glu Lys Ser Val Glu Thr Val Leu Thr Phe Glu	
235 240 245	
TTA ACA GAA AAA GCG ATC ATG ACT AAA ATA AAT ATA TAT ACA GAT ACG	1064
Leu Thr Glu Lys Ala Ile Met Thr Lys Ile Asn Ile Tyr Thr Asp Thr	
250 255 260	
CTT CGA CAT GGA GAT CGT CCA CTT CGG ACT GGT CTT GAT CTA TGT CAG	1112
Leu Arg His Gly Asp Arg Pro Leu Arg Thr Gly Leu Asp Leu Cys Gin	
265 270 275	
AAA TTA TCA TGT TTG ACG TTT AAT GAC CTT AAA GAA CAG CAA AAG CAC	1160
Lys Leu Ser Cys Leu Thr Phe Asn Asp Leu Lys Glu Gin Gin Lys His	
280 285 290	
TAT TTA GAT AAG TTT TGG CTT TAC GCA GAT GTA GAA ATA TCT GGA GAT	1208
Tyr Leu Asp Lys Phe Trp Leu Tyr Ala Asp Val Glu Ile Ser Gly Asp	
295 300 305 310	
CAG GCG CTC CAA GAA GGG ATA CGC TTT AAC TTA TTT CAT TTG CTA CAA	1256
Gln Ala Leu Gin Glu Gly Ile Arg Phe Asn Leu Phe His Leu Leu Gln	
315 320 325	
TCA GCA GGG CGC GAT CGT TTT TCA AAT ATA GCT GCA AAA GGT TTG TCA	1304
Ser Ala Gly Arg Asp Arg Phe Ser Asn Ile Ala Ala Lys Gly Leu Ser	
330 335 340	
GGC GAA GGG TAT GAA GGG CAT TAT TTT TGG GAT ACC GAA ATA TAT ATG	1352
Gly Glu Gly Tyr Glu Gly His Tyr Phe Trp Asp Thr Glu Ile Tyr Met	
345 350 355	
GTG CCA GTT TTC TTG ATG ACG AAT CCT GAG TTA GCA AAG CAA TTG CTC	1400
Val Pro Val Phe Leu Met Thr Asn Pro Glu Leu Ala Lys Gin Leu Leu	
360 365 370	
ATT TAT CGA TAT TCA ATC CTA GAT AAA GCA CGT GAA AGA GCA AGG GAA	1448
Ile Tyr Arg Tyr Ser Ile Leu Asp Lys Ala Arg Glu Arg Ala Arg Glu	
375 380 385 390	
ATG GGC CAT AGA AAA GGC GCT TTA TTT CCA TGG CGA ACA ATA TCA GGA	1496
Met Gly His Arg Lys Gly Ala Leu Phe Pro Trp Arg Thr Ile Ser Gly	

395	400	405	
GGA GAA TGT TCT TCT TAT TTT CCA GCT GGA ACA GCT CAG TAC CAT ATT			
Gly Glu Cys Ser Ser Tyr Phe Pro Ala Gly Thr Ala Gln Tyr His Ile			
410	415	420	
AGT GCA GAT ATC GCT TAT AGT TAC GTT CAA TAT TAC TTA GTT ACG AAA			
Ser Ala Asp Ile Ala Tyr Ser Tyr Val Gln Tyr Tyr Leu Val Thr Lys			
425	430	435	
GAT TTG GAT TTC CTA AAA TCT TAT GGA GCT GAA CTG TTA ATT GAA ACA			
Asp Leu Asp Phe Leu Lys Ser Tyr Gly Ala Glu Leu Leu Ile Glu Thr			
440	445	450	
GCT CGT CTC TGG ATG GAT ACC GGA CAT TAT CAT GAA GGA AAA TTT AAA			
Ala Arg Leu Trp Met Asp Thr Gly His Tyr His Glu Gly Lys Phe Lys			
455	460	465	470
ATT GAT GCT GTA ACG GGG CCT GAC GAG TAT ACG TGT ATT GTG AAC AAT			
Ile Asp Ala Val Thr Gly Pro Asp Glu Tyr Thr Cys Ile Val Asn Asn			
475	480	485	
AAC TAT TAC ACG AAC GTG ATG GCA AAG CAC AAT TTG CGC TGG GCA GCC			
Asn Tyr Thr Asn Val Met Ala Lys His Asn Leu Arg Trp Ala Ala			
490	495	500	
AAA AGT GTC GCT GAA TTA GAA AAA CAT GCA CCT GAT ACA TTA GCA TCA			
Lys Ser Val Ala Glu Leu Glu Lys His Ala Pro Asp Thr Leu Ala Ser			
505	510	515	
TTA AAA GCA AAG CTT GAA ATT ACT GAC GAG GAA ATA GCA GAA TGG ATA			
Leu Lys Ala Lys Leu Glu Ile Thr Asp Glu Glu Ile Ala Glu Trp Ile			
520	525	530	
AAA GCA GCT GAA GCT ATG TAT TTG CCT TAT GAT CCA ACA CTT AAT ATT			
Lys Ala Ala Glu Ala Met Tyr Leu Pro Tyr Asp Pro Thr Leu Asn Ile			
535	540	545	550
AAC CCG CAG GAT GAC ACA TTT TTG CAG AAA CAA GTT TGG GAT TTC GAT			
Asn Pro Gln Asp Asp Thr Phe Leu Gln Lys Gln Val Trp Asp Phe Asp			
555	560	565	
AAT ACG CCG AAA GAA CAT TAC CCG CTT CTC TTG CAT TAT CAT CCG TTG			
Asn Thr Pro Lys Glu His Tyr Pro Leu Leu Leu His Tyr His Pro Leu			
570	575	580	
ACT TTA TAT CGC TAC CAA GTA TGT AAG CAG GCC GAT ACA GCA CTG GCT			
Thr Leu Tyr Arg Tyr Gln Val Cys Lys Gln Ala Asp Thr Val Leu Ala			
585	590	595	
CAT TTT TTA TTA GAG GAT GAA CAA GAT GGA TCT GTG ATT CGA GAT TCT			
His Phe Leu Leu Glu Asp Glu Gln Asp Gly Ser Val Ile Arg Asp Ser			
600	605	610	
TAT CAT TAT TAT GAA AAA ATC ACT ACT CAC GAT TCT TCC CTA TCT TCA			
Tyr His Tyr Tyr Glu Lys Ile Thr Thr His Asp Ser Ser Leu Ser Ser			
615	620	625	630
TGT GTG TTT AGT ATT ATG GCT GCA AAA ATT GGC GAA TTA GAC AAG GCT			
Cys Val Phe Ser Ile Met Ala Ala Lys Ile Gly Glu Leu Asp Lys Ala			
635	640	645	
TAT GAA TAT TTT ATT GAA ACA GCT CGT CTC CAT ATG GCG AAT ATG GGA GGA ACG TGG			
Tyr Glu Tyr Phe Ile Glu Thr Ala Arg Leu Asp Leu Asp Asn Thr His			
650	655	660	
GGT AAT ACG AAA GAC GGT CTC CAT ATG GCG AAT ATG GGA GGA ACG TGG			
			2312
1544			
1592			
1640			
1688			
1736			
1784			
1832			
1880			
1928			
1976			
2024			
2072			
2120			
2168			
2216			
2264			

## 配列番号2

配列の長さ：20

### 配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

### トポロジー：直鎖状

### 配列の種類：ペプチド

### フラグメントの型：N末端フラグメント

配列

Ser Trp Ser Ile Ser Ser Asn Gln Leu Asn Ile Glu Asn Leu Leu Asn  
1 5 10 15  
Glu Glu Ser Leu  
20

配列番号 3

配列の長さ: 2796

### 配列の型：核酸

鎮の数：2本鎮

### トポロジー：直鎖状

### 配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: バチルス・ステアロサーモフィラス

株名：SK-1

### 配列

CAATTAGATA	ATTGAAAATC	AGAGGGAGAT	CGAAGGGGATT	CTTCTTGTG	TGGAAATCGG	60
TGAGAATCGG	AGGGCAAGC	AGTTTTCGCC	GTTCATCGC	GATGTGTCCA	TTCCGAAAGA	120
TTTACTGTA	CCATATGATT	GGATGGTAAA	CTATACCTT	CTTATCATT	CGAAAAAATG	180
TAAGCCCAT	CAAATGATA	GTGATGAC	TCTAGTTGT	AAAAATCAT	AAAGGAGTTC	240
TTTTTGGGC	TCAAGGTTGA	AAACAAATCA	GTCAATCAT	ATGCTGCTAT	CGTTCTGAC	300
CTTTGATTG	TGCTGATTTC	CCAGATATAA	ATCGTATCG	AATCAACATC	CGTCAGAGTA	360
AAAGAATAAT	GAAACAGGAG	TGTCTTACAT	GTCTGGTCA	ATTAGCTCCA	ATCAGCTTAA	420
TATTGAAAAC	TTGTTAAATG	AAGAAAGTCT	CTTTTCACT	GGTAATGGGT	ATATGGTGT	480
ACGTGGAAAT	TTCGAAGAAA	AATATTATGA	TGGTGTTCG	TCAATTGCG	GTACATATAT	540
CAATGCATTC	CACGATATAA	CTGATATTAA	CTACGGTGAA	AAATTATATG	CATTCCTGAA	600
AAACCAACAG	AACTTAGTGA	ATGTCATGAA	TGGCCTAACT	GTTCAAATAT	ACTTTGGAGA	660
AGAAGAAGAA	AGGTTTTCG	TTTTGAAAGG	AGAAGTCATT	CAATATGAAC	GGCCTATCCA	720
TATGGACAAA	GGCTTTTCAG	AACTGTGAT	TCATTGGGT	TCTCTGGAG	GGAAAGAAGT	780

CAAACTCAAG TTTAAAAGGT TAACTTCATT CATTATAAA GAACTTTCA TACAGGAAT 840  
 TACAATTGAA CCCGTTAATT TTTTGGAA AACGAAGGTG GTTTCACAG TTAACGGAGA 900  
 TGTCTCAAT TTTGTTGATC CAAGTGATCC ACGGGTCGGT TCAGGACATG CGAAGCTCT 960  
 GACAGTCTG GATAAGGTTA TTGAGGGGA TTTGTTAGT ATAGAAACAA AAACGAAACG 1020  
 GTCAAATCTT TATGCCCTT GTACATCAAC ATGCAGACTA AACATGATT TTCAGCGAGA 1080  
 ATATGTTAAA AATGAGAAGT CGGTTGAAAC TGTACTCACT TTTGAATTAA CAGAAAAAGC 1140  
 GATCATGACT AAAATAATA TATATACAGA TACGCTTCGA CATGGAGATC GTCCACTTCG 1200  
 GACTGGTCTT GATCTATGTC AGAAATTATC ATGTTGAGC TTAAATGACC TTAAAGAAC 1260  
 GCAAAAGCAC TATTTAGATA AGTTTGGCT TTACGCAGAT GTAGAAATAT CTGGAGATCA 1320  
 GGCCTCCAA GAAGGGATAC GCTTTAATT ATTTCATTG CTACAACTAG CAGGGCGCGA 1380  
 TGTTTTCA AATATAGCTG CAAAGGTTT GTCAGGGAGA GGGTATGAAG GGCATTATTT 1440  
 TTGGGATACC GAAATATATA TGGTGCCAGT TTTCTTGTG AGCAATCCTG AGTTAGCAAA 1500  
 GCAATTGTC ATTATATGAT ATTCAATCTT AGATAAACGA CGTGAAGAG CAAGGGAAAT 1560  
 GGGCCATAGA AAAGGCGCTT TATTTCCATG GCGAACAAATA TCAGGGAGG AATGTTCTC 1620  
 TTATTTCCA GCTGGAACAG CTCACTACCA TATTAGTGC AATATGCTT ATAGTTACGT 1680  
 TCAATATTAC TTAGTTACGA AAGATTTGA TTTCTAAA TCTTATGGAG CTGAACTGTT 1740  
 AATTGAAACA GCTGCTCTG GGATGGATAC CGGACATTAT CATGAAGGAA AATTAAAAT 1800  
 TGATGCTGTA ACGGGGCTG ACGAGTATAC GTGTTATTGTA AACAATAACT ATTACACGAA 1860  
 CGTGTGGCA AAGCACAATT TGGCTGGGC AGCCAAAAGT GTGCTGAAT TAGAAAACA 1920  
 TGCACCTGAT ACATAGCAT CATTAAAAGC AAAGCTTGA ATTACTGAGG AGGAAATAGC 1980  
 AGAATGGATA AAAGCAGCTG AAGCTATGTA TTTGCCTTAT GATCCAACAC TTAATATTA 2040  
 CCGCAGGAT GACACATTG TGCAGAAACA AGTTTGGAT TTGATAATA CGCCGAAAGA 2100  
 ACATTACCG CTTCTCTTGC ATTATCATCC GTTGAATT TATCGTACCC AAGATGTAA 2160  
 GCAGGCCGAT ACAGTACTGG CTCTTTTT ATTAGAGGAT GAACAAGATG GATCTGTGAT 2220  
 TCGAGATTCT TATCATTATT ATGAAAAAAAT CACTACTCAC GATTCTCCC TATCTTCATG 2280  
 TGTTGTTAGT ATTATGGCTG CAAAAATTGG CGAATTAGAC AAGGCTTATG AATATTTAT 2340  
 TGAACAGCT GTTTAGATT TAGATAATAC ACATGGTAAT ACGAAAGAOG GTCTCCAT 2400  
 GGCGAATATG GGAGGAACGT GGATGGCGAT TGTGTTGGAG TTTGCTGGCC TTGGATC 2460  
 AGAAAGCGGG TTGTCATTAG CGCCAGTGTAT TCCAAACAA TGGCAGTCAT ATAGTTTC 2520  
 GATTCAATAT TTAGGTAGAC ACATTCAGT CTCCGTTGAT AAAAAAGGGA CGAAAGTGA 2580  
 TCTTTGAAT GGAGAGGAAC TAACTATCAA ACTTTATGGT AAAAAGCATC AATTAACAAA 2640  
 AGATGAACT TTGAAATAA CATTAAATAA CGGGCGTGT GATTAACCAA TAAAAACAG 2700  
 TTACCATTTGG CCTATTGAT GCTTTCTGC CGAAGTCGGA AAAGCTTGT CTTTAATGG 2760  
 CTATATAGAC TTATTGCGAT GCTACTAOGT CTTTAT 2796

配列番号4

配列の長さ：340

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：バチルス・ステアロサーモフィラス

株名：SK-1

配列

TTGCTTGGTG GAGGAAAAAC GGCTGTCACTC GAAATGGCCG CTGCTTCAGG ACTACATCTT 60  
 GTTCCGAAAG AAAAACGAA TCCACTGATC ACCACAACGA GAGGAACAGG GGAATTGATT 120  
 CGAGCGGCTC TTGATGTGGG AGTCGAGCAT ATTATTATCG GAATCGGTGG AAGCGCGACG 180  
 AACGATGGTG GAGCGGGAAAT GGTTCAAGGG CTAGGCGGCC GACTTCTTGA TCGACATGGG 240  
 AATGAGATTG CGTATGGCGG TGGAAGTTA TCACAATTAG CAACGATTGA TCTTTCTTAT 300  
 TTAGACCGGA GTTAAAGAA CGTAAAATC GAAGTCGTT 340

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の耐熱性トレハロースホスホリラーゼの至適温度

【図2】本発明の耐熱性トレハロースホスホリラーゼの

熱安定性

【図3】本発明の耐熱性トレハロースホスホリラーゼの至適pH

【図4】本発明の耐熱性トレハロースホスホリラーゼの

## pH安定性

【図1】

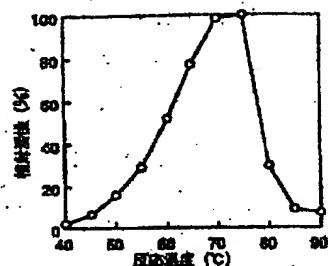


図1 pH安定性(15分間50°C)

【図5】本発明のプラスミドベクターpSTP1構造

【図2】

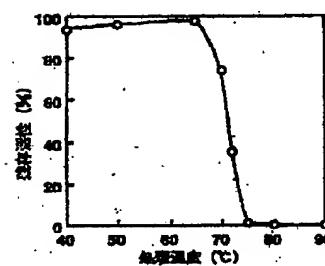


図2 pH安定性(15分間50°C)

【図3】

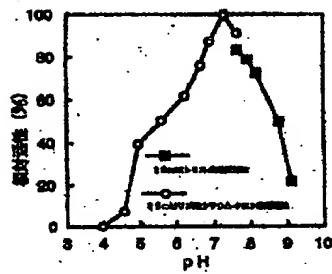


図3 pH安定性

【図4】

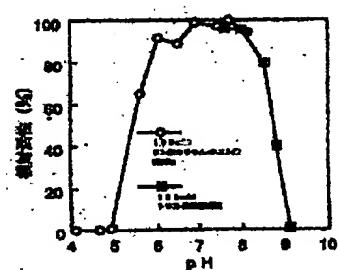
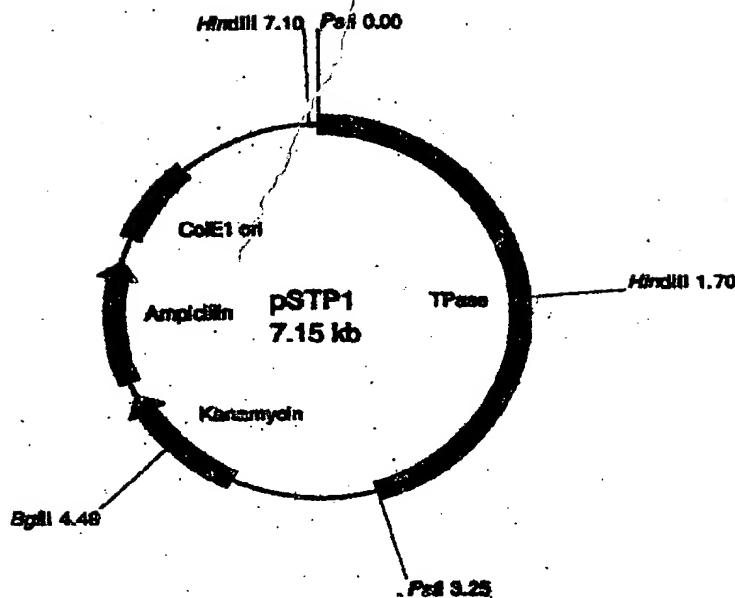


図4 pH安定性(30°C, 24時間25°C)

【図5】



## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 8	識別記号	F I
C 12 P 19/12		C 12 P 19/12
//(C 12 N 15/09	ZNA	
C 12 R 1:07)		
(C 12 N 15/09	ZNA	
C 12 R 1:19)		
(C 12 N 1/21		
C 12 R 1:19)		
(C 12 N 9/12		
C 12 R 1:19)		
(C 12 N 9/12		
C 12 R 1:07)		

(72) 発明者 大島 良恵  
 千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業  
 株式会社総合研究所内

(72) 発明者 山根 國男  
 茨城県土浦市常名4016-44